



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10155481 A**(43) Date of publication of application: **16 . 06 . 98**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/00
C07H 21/04**(21) Application number: **09159963**(22) Date of filing: **17 . 06 . 97**(30) Priority: **18 . 06 . 96 JP 08157245
02 . 10 . 96 JP 08261497**(71) Applicant: **RIKAGAKU KENKYUSHO**(72) Inventor: **HAYASHIZAKI YOSHIHIDE**(54) **DNA RECOVERING PROCESS**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently obtain DNA from microorganism by bacteriolyzing microbial fungus in the presence of a carrier, making the obtained DNA adsorbed on the carrier, separating the used solution from the carrier and making the adsorbed DNA eluted and recovered by an eluting solution.

SOLUTION: The process consists of bacteriolyzing microbial fungus, making free DNA adsorbed on the carrier, and then recovering the adsorbed DNA, namely DNA contained in microorganism is easily obtained by using the following chaotropic ion process. The

microbial fungus is bacteriolized in the presence of the carrier such as glass, silica gel, an anion exchange resin, hydroxyapatite, zeolite, etc., by adding a bacteriolyzing solution comprising a microbial cell body wall degrading solution, alkali-ionizing surface active agent solution and neutralizing solution to the DNA solution obtained by bacteriolysis is added a solution for adsorption of DNA containing chaotropic ion allowing DNA to be adsorbed on the carrier, the solution used for bacteriolysis and adsorption is separated from the carrier, and the DNA adsorbed on the carrier is recovered by eluting it with DNA eluting solution.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-155481

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 15/00

Z

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-159963

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月17日

(31) 優先権主張番号 特願平8-157245

(32) 優先日 平8(1996) 6月18日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平8-261497

(32) 優先日 平8(1996)10月2日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 林崎 良英

茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1

理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内

(74) 代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 DNAの回収方法

(57) 【要約】

【課題】 カオトロピックイオン法を利用して、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により精製されたDNAを回収する方法の提供。

【解決手段】 微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法。①担体の存在下、微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、溶菌及び吸着のために用いた溶液を前記担体から分離する工程、及び前記担体に吸着したDNAをDNA溶出用溶液で溶出させて回収する工程からなる。②溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に担体を設けたカラムに微生物菌体を供給する工程、次いで、前記カラム中の微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、前の工程で溶菌及び吸着のために用いた溶液を吸引によりカラムから除去する工程、カラムにDNA溶出用溶液を供給し、吸引して前記担体に吸着したDNAを回収する工程からなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法であって、

前記担体の存在下、微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、溶菌及び吸着のために用いた溶液を前記担体から分離する工程、及び前記担体に吸着したDNAをDNA溶出用溶液で溶出させて回収する工程からなることを特徴とするDNAの回収方法。

【請求項2】 微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法であって、

溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に担体を設けたカラムに微生物菌体を供給する工程、

次いで、前記カラム中の微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、前の工程で溶菌及び吸着のために用いた溶液を吸引によりカラムから除去する工程、

カラムにDNA溶出用溶液を供給し、吸引して前記担体に吸着したDNAを回収する工程からなることを特徴とするDNAの回収方法。

【請求項3】 微生物菌体の供給を、微生物菌体を含む培養液を供給し、次いで液を吸引して微生物菌体をメンブレンフィルターで捕捉することにより行う請求項2に記載の方法。

【請求項4】 微生物菌体に溶菌用溶液及びDNA吸着用溶液を順次添加して担体にDNAを吸着させる請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 溶菌用溶液が菌体の細胞壁分解溶液（溶液I）、アルカリイオン化表面活性剤溶液（溶液II）及び中和液（溶液III）からなり、DNA吸着用溶液がカオトロピックイオン含有溶液である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 溶液IがTris-EDTA-グルコース-リゾチーム水溶液であり、溶液IIがNaOH-SDS水溶液であり、溶液IIIが酢酸カリウム水溶液である請求項5に記載の方法。

【請求項7】 微生物菌体に溶菌用溶液並びに中和及びDNA吸着用溶液を順次添加して担体にDNAを吸着させる請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 溶菌用溶液が菌体の細胞壁分解溶液（溶液I）、及びアルカリイオン化表面活性剤溶液（溶液II）からなり、中和及びDNA吸着用溶液が中和剤とカオトロピックイオンとを含有する単一の溶液である請求項7に記載の方法。

【請求項9】 溶液IがTris-EDTA-グルコース-リゾチーム水溶液であり、溶液IIがNaOH-SDS水溶液であり、中和及びDNA吸着用溶液が酢酸カリウムカオトロピック

イオンとを含有する溶液である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 溶液IがRNaseを含有する請求項5または8に記載の方法。

【請求項11】 中和及びDNA吸着用溶液が6～12の範囲のpHに調整されている請求項7に記載の方法。

【請求項12】 DNA溶出用溶液で溶出前の担体を洗浄し、乾燥する請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 担体がガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト及びセライトからなる群から選ばれる請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】 担体が、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末である請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物に含まれるDNAを回収する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子工学の分野において、大腸菌等の微生物を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、複製増幅した形質転換体から所望のプラスミドDNAを回収することが常時行われている。ところが形質転換体からプラスミドDNAを回収精製するに複数の工程が必要であり、手間が掛かる。そこで、より簡単にプラスミドDNAを回収精製する方法が提案されている。例えば、特開平4-360686号公報には、微生物菌体を溶菌した溶液から、メンブレンフィルターを介して溶液中の不溶物を除去し、ついで限外ろ過により不純物を除去してDNAを濃縮するプラスミドDNA及び／又はコスミドDNAの精製方法が開示されている。

【0003】さらに、特開平8-23976号公報には、平均孔径が10nm～35nmであるろ過フィルターによりプラスミド混合液から不純物を除去するスーパーコイル状のプラスミドDNAの精製方法が開示されている。しかしながら、これらの方法では、精製されたDNA中に、微生物菌体にDNAとともに含まれるRNAも含まれてしまい、DNAのみを回収するためには別途RNAの分解の工程を必要とする。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】ところで、RNAとDNAとを分離する方法として、DNA吸着性の担体とカオトロピックな溶液とを併用する方法（カオトロピックイオン法）が知られている[R. Room et al., J. Clin. Microbiol. Vol. 28, No. 3, p495-503]。この方法を利用して、微生物菌体にDNAとともに含まれるRNAを除去してDNAのみを精製する方法が特開平7-250681号公報に開示されている。この方法は形質転換体培養液を第1のDNA抽出精製用カートリッジに集菌する工程、溶菌及び不要RNAの分離工程、第1のDN

A抽出精製用カートリッジによる不純物濾過工程、第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を含むプラスミドDNAの抽出精製方法である。

【0005】ところが、この方法は、2つのカートリッジを使用しなければならず、しかも上記第1のDNA抽出精製用カートリッジは少なくともトラップフィルターとメンブレンフィルターを有し、第2のDNA抽出精製用カートリッジは少なくともガラス繊維フィルターとガラスパウダー層とメンブレンフィルターとを有するものであり、単なるフィルターに比べて構造も複雑である。さらにこの方法では、上記2つのカートリッジを使用して、溶液の供給と排出（吸引による）を何回も繰返行う必要がある。

【0006】そこで本発明の目的は、カオトロピックイオン法を利用して、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により精製されたDNAを回収する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法であって、前記担体の存在下、微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、溶菌及び吸着のために用いた溶液を前記担体から分離する工程、及び前記担体に吸着したDNAをDNA溶出用溶液で溶出させて回収する工程からなることを特徴とするDNAの回収方法（第1方法）に関する。

【0008】さらに本発明は、微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法であって、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に担体を設けたカラムに微生物菌体を供給する工程、次いで、前記カラム中の微生物菌体を溶菌し、かつ溶菌により得られるDNAを前記担体に吸着させる工程、前の工程で溶菌及び吸着のために用いた溶液を吸引によりカラムから除去する工程、カラムにDNA溶出用溶液を供給し、吸引して前記担体に吸着したDNAを回収する工程からなることを特徴とするDNAの回収方法（第2方法）に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】以下本発明について説明する。本発明は、第1方法及び第2方法とも、微生物菌体を溶菌し、遊離のDNAを担体に吸着し、担体に吸着したDNAを回収する方法である。本発明の方法の対象となる微生物菌体は特に制限はない。目的とするDNAを含む微生物菌体であればよい。例えば、宿主微生物に目的とするDNAを導入した形質転換体であることができる。

【0010】本発明の方法における①微生物菌体の溶菌、②遊離DNAの担体への吸着及び溶出は、それぞれ公知の方法である。しかるに本発明の方法の特徴は、上

記微生物菌体の溶菌及び遊離DNAの担体への吸着を1ポットで行うことである。本発明の第1方法では、担体の存在下、微生物菌体に溶菌用溶液及びDNA吸着用溶液を順次添加して前記担体にDNAを吸着させるか、または担体の存在下、微生物菌体に溶菌用溶液並びに中和及びDNA吸着用溶液を順次添加して前記担体にDNAを吸着させる。ガラスは、カオトロピックイオンを含有するDNA吸着用溶液の存在下でDNAは吸着するがRNAは吸着しない[R. Room et al., J. Clin. Microbiol. Vol. 28, No. 3, p495-503]ものである。担体としては、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト及びDiatomaceous Earthのようなセライトから選ぶことができる。担体の形状には特に制限はないが、吸着用の大きい表面積を有するものが好ましい。担体は、例えば、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末であることができる。例えば、担体は、例えば、ガラスフィルター、ガラスビーズまたはガラス粉末であることができる。

【0011】DNA吸着用溶液は、カオトロピックイオンを含有する溶液である。また、溶菌用溶液は、菌体の細胞壁分解溶液（溶液I）、アルカリイオン化表面活性剤溶液（溶液II）及び中和液（溶液III）からなるか、または、菌体の細胞壁分解溶液（溶液I）及びアルカリイオン化表面活性剤溶液（溶液II）からなることができる。但し、後者の場合（溶菌用溶液が溶液I及び溶液IIからなる場合）は、中和剤とカオトロピックイオンとを含有する単一の溶液である中和及びDNA吸着用溶液を用いる。

【0012】菌体の細胞壁分解溶液（溶液I）は、菌体をスフェロプラスト化する働きがあり、例えば、Tris-EDTA-グルコース-リゾチーム水溶液（溶液I）を挙げることができる。また、アルカリイオン化表面活性剤溶液（溶液II）は、菌体の膜とタンパク質とを溶解して溶菌すると共にDNAを変性させる働きがあり、例えば、NaOH-SDS水溶液（溶液II）を挙げることができる。中和液（溶液III）は、溶液IIによりアルカリ性になった溶液を中和する働きがあり、例えば、酢酸カリウム水溶液を挙げることができる。溶菌は、これら3種類または2種類の溶液を菌体に順次添加していくことで行うことができる。各溶液の濃度や使用量は、菌体の種類や量に応じて適宜決定できる。

【0013】中和及びDNA吸着用溶液として中和剤（例えば、酢酸カリウム）とカオトロピックイオンとを含有する溶液を用いることで、溶液の中和と並行してDNAの吸着を行うことができ、処理時間を短縮できるという利点がある。また、DNA吸着用溶液として、中和剤とカオトロピックイオンとを含有する溶液を用いる場合、溶液のpHを6～12の範囲に調整しておくことが、RNAの混入を防止するという観点から好ましい。但し、このpH範囲は、イオン強度によってもことなる

ので、条件により適宜決定できる。尚、RNAの混入を防止するために、溶液 I に RNase を添加しておくこともできる。

【0014】また、DNA吸着用溶液並びに中和及びDNA吸着用溶液であるカオトロピックイオンを含有する溶液は、例えば、LiClO₄、KI、NaI、LiCl、NaCO₂H、塩酸グアニジン等を含有する水溶液を挙げることができる。カオトロピックな溶液の濃度や使用量等は、菌体の種類や量に応じて適宜決定できる。DNA吸着用溶液又は中和及びDNA吸着用溶液は、先に溶菌用溶液を添加した菌体との混合物に担体の存在下、さらに添加する。DNA吸着用溶液を添加することで、菌体から溶解したDNAが担体に吸着される。本発明の特徴は、上記添加された各溶液は、前に添加された溶液を分離除去することなくそのまま順次注ぎ足され、添加の都度、溶液の分離の必要がない点にある。尚、各溶液の添加は、1つの溶液を添加した後、例えば、1秒〜60分程度放置した後、次に次の溶液を添加することで行うことが、各操作を確実に行うという観点から好ましい。

【0015】次にDNAが吸着した担体を溶液と分離する。担体と溶液との分離は、デカンテーション、遠心分離、濾過等の方法で行うことができる。溶液から分離した担体は、必要により洗浄し、乾燥することもできる。洗浄には例えば、Tris-EDTA-NaCl/エタノール混合液、エタノール、エタノール/グリセロール混合溶液等を使用することができる。次に、前記担体に吸着したDNAをDNA溶出用溶液で溶出させて回収する。DNA溶出用溶液は、例えば、Tris-EDTA 緩衝液を用いることができる。

【0016】本発明の第2方法では、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に担体を設けたカラムを使用する。このカラムを使用することで、分離回収操作をより簡便に行うことができる。また、少量かつ複数のサンプルを同時に並行して処理するという場合、複数のカラムを束ねたものを用いることができる。また、複数の貫通孔を有するプレートの一方向の開口にメンブレンフィルターを設け孔（ウェル）中に担体を充填したものをカラムとして使用することもできる。

【0017】メンブレンフィルターは、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するものであれば特に制限はない。市販のメンブレンフィルターをそのまま使用することができる。また、担体は、上記第1方法で説明したものと同様のものを使用できる。カラムの大きさや形状等は、処理する菌体の量や溶液の量を考慮して適宜決定できる。上記カラム中に微生物菌体を供給する。供給する微生物菌体は、別途濾過や遠心分離等により培養液から分離したものでもよいが、微生物菌体を含む培養液をそのまま上記カラムに供給し、液を吸引して微生物菌体をメンブレンフィルターで捕捉することにより、微生

物菌体を供給することもできる。

【0018】次いで、前記カラムに溶菌用溶液及びDNA吸着用溶液を順次添加して前記担体にDNAを吸着させるか、または前記カラムに溶菌用溶液並びに中和及びDNA吸着用溶液を順次添加して前記担体にDNAを吸着させる。ここで使用する溶菌用溶液、DNA吸着用溶液並びに中和及びDNA吸着用溶液は上記第1方法で説明したものと同様のものである。前述のように、本発明の特徴は、カラムに添加された各溶液は、前に添加された溶液を分離除去することなくそのまま順次注ぎ足され、添加の都度、溶液の分離の必要はない。

【0019】全ての溶液の添加が終了した後、溶液をメンブレンフィルターを介した吸引によりカラムから除去する。これにより、菌体の残渣はフィルター上に残り、またDNAも担体に吸着されて、フィルター上に残る。次いで、担体を含めてカラムを、必要により洗浄して遊離のRNAやタンパク質等の夾雑物を除去した後、乾燥することができる。回収するDNAの純度を高めるという観点からは、上記洗浄を行うことが好ましい。洗浄には例えば、Tris-EDTA-NaCl/エタノール混合液、エタノール、エタノール/グリセロール混合溶液等を使用することができる。次いで、カラムにDNA溶出用溶液を供給し、吸引して前記担体に吸着したDNAを回収する。DNA溶出用溶液は、例えば、Tris-EDTA 緩衝液を用いることができる。

【0020】本発明の第1方法及び第2方法のいずれも、溶菌用溶液及びDNA吸着用溶液又は中和及びDNA吸着用溶液を順次添加する工程、担体を溶液から分離する工程、及び担体からDNAを溶出する工程の3つの工程からなり、この3つの工程により、微生物菌体からDNAを回収できる。さらに、DNAの溶出工程の前に夾雑物の洗浄工程を設けることが、回収したDNAの純度を高めるという観点からは好ましい。本発明の方法により回収されるDNAは2本鎖環状プラスミドDNAであり、コスミドDNA、Bacterial Artificial Chromosome (BAC)、Pl-derived Artificial Chromosome (PAC) もプラスミドDNAに含まれる。

【0021】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明について詳細に説明する。

実施例1

マウス由来である 5.6 kb の cDNA を挿入したプラスミド pBluescript SK (+) を有する大腸菌 SOL R 株を 100 µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地中で一晚培養した。この内 0.6 ml の培養液を 96 穴のガラスフィルターとメンブレンで閉じたウェルに移し、吸引により液をろ過して菌体をガラスフィルター中に集めた。菌体を含む各ウェルに 25 µl の溶液 I (50 mM グルコース、25 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 8.0]、10 mM EDTA、10 mg/ml リゾチーム) を加え、5 分間放置した。その後、50 µl の溶液 II

(0.2N 水酸化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム)を加えて5分間放置後、37.5 μ lの溶液III(3M酢酸カリウム[pH4.8])を加えて5分間放置した。さらに120 μ lの7Mグアニジン塩酸塩溶液(吸着用溶液)を加えて吸引によりろ過した。

【0022】次に、300 μ lの洗浄緩衝液(100mMトリス塩酸緩衝液[pH8.0]、5mM EDTA、0.2M塩化ナトリウム、60%エタノール)を加えて吸引によりろ過する工程を2回、300 μ lの80%エタノールで1回、300 μ lの100%エタノールで1回行った。その後、吸引を20分間行ってガラスフィルター上のプラスミドDNAを乾燥し、最後に65%に温めたTE緩衝液(10mMトリス塩酸[pH8.0]、1mM EDTA)を25~50 μ l加えて吸引することによりプラスミドDNAを溶出した。この操作により4~6 μ gのプラスミドDNAを得ることが出来た。また、その純度は280nmに対する260nmの吸光度比が2前後と高く、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定法に用いても十分使用可能であった。

【0023】実施例2

マウス由来である5.6 kbのcDNAを挿入したプラスミドpBluescript SK(+)を有する大腸菌SOLR株を100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地中で一晩培養した。この内0.6mlの培養液を96穴のガラスフィルターとメンブレンで閉じたウェルに移し、吸引により液をろ過して菌体をガラスフィルター中に集めた。菌体を含む各ウェルに25 μ lの溶液I(50mM グルコース、25mMトリス塩酸緩衝液[pH8.0]、10mM EDTA、10mg/ml リゾチーム)を加え、5分間放置した。その後、50 μ lの溶液II(0.2N 水酸化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム)を加えて5分間放置後、160 μ lの中和及び吸着用

Diatomaceous Earth (Bio RAD Co & Ltd.)	15~20 μ g
ガラス粉末(リケン)	5 μ g
多孔質高表面積ガラス(Bio101)	10~20 μ g
アニオン交換樹脂(Qiagen)	5 μ g

* 溶液)を加えて5分間放置した。

【0024】次に、ウェルから吸引により混合溶液をろ過した後、300 μ lの80%エタノールで3回、300 μ lの80%エタノール-20%グリセロールで1回洗浄した。その後、吸引を20分間行ってガラスフィルター上のプラスミドDNAを乾燥し、最後に65%に温めたTE緩衝液(10mMトリス塩酸[pH8.0]、1mM EDTA)を25~50 μ l加えて吸引することによりプラスミドDNAを溶出した。

【0025】この操作により4~6 μ gのプラスミドDNAを得ることが出来た。また、その純度は280nmに対する260nmの吸光度比が2前後と高く、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定法に用いても十分使用可能であった。また、吸着用溶液として酢酸カリウムとグアニジン塩酸塩の混合溶液を用いたため、実施例1に比べて処理時間を約15分間短縮することができた。また、洗浄に80%エタノール-20%グリセロールを用いることで、100%エタノールを用いた実施例1に比べて溶出に用いるTE緩衝液のガラスフィルターへの浸透が良く、プラスミドDNAの回収量に若干の改善が見られるという利点があった。

【0026】実施例3

ガラスフィルターの代わりに、担体としてDiatomaceous Earth (Bio RAD Co & Ltd.)、ガラス粉末(リケン)、多孔質高表面積ガラス(Bio101)またはアニオン交換樹脂(Qiagen)を用いた以外は実施例1と同様の操作を繰り返して、各担体について4~6 μ gのプラスミドDNAを得た。4~6 μ gのプラスミドDNAが最大収量であるので、上記収量は実施例1と同程度であった。担体mg当たりのプラスミドDNAの収量は、担体の表面積に比例し、担体10mg当たりのプラスミドDNAの回収効率を以下に示す。